(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12P 13/02 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0119139
(43) 공개일자 2006년11월24일

(21) 출원번호 10-2005-0041739
(22) 출원일자 2005년05월18일
심사청구일자 2005년05월18일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 황한준
서울 광진구 구의1동 239-60
이창운
서울 강동구 암사동 495-78 삼화빌라트 202호
김태훈
경남 거제시 능포동 옥명대우아파트 103-502

(74) 대리인 이문섭
윤여강

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 홍국균을 이용한 ＧＡＢＡ 생산방법

(57) 요약

본 발명은 홍국균을 이용한 GABA 생산방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 홍국균을 껍질을 벗기지 않은 발아된 메밀을 기질로 함유하는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 GABA (γ-aminobutyric acid)의 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에서는, 신경안정, 혈압강하 효과를 가지는 γ-aminobutyric acid (GABA) 고생산하는 홍국균을 선발하였으며, 이 선발된 홍국균을 이용하여 다양한 곡류를 기질로 이용한 홍국들을 제조하고 그중에서 GABA 생산성이 탁월한 발아된 통메밀을 기질로 선택하여 새로운 고기능성 홍국을 개발하였으며, 또한 발아된 통메밀 홍국의 GABA 생산성을 더욱 향상시키기 위하여 고체배양 최적화 조건을 개발하였다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

홍국균을 껍질을 벗기지 않은 발아된 메밀을 기질로 함유하는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 GABA (γ-aminobutyric acid)의 생산방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (ATCC 6405), 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (IFO 32228) 또는 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (ATCC 16358)인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 배지는 탄소원으로서 5% 내지 15% 농도의 푸럭토스(Fructose) 또는 글루코스(Glucose)를 함유하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 배지는 질소원으로서 1% 내지 4% 농도의 모노소디움 글루타메이트(MSG), 알라닌(Alanine) 또는 (Glutamate)를 함유하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 배지는 유기화합물로서 0.5% 내지 1.5% 농도의 글리세롤(Glyerol) 또는 에탄올(Ethanol)를 함유하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 배지는 미네랄로서 0.1% 내지 0.5% 농도의 인산나트륨(NaH2PO4) 또는 질산나트륨(NaNO3)을 함유하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 배양 pH는 3 내지 6이고, 배양 온도는 26 내지 30℃인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 배지의 탄소원은 5-10% 푸럭토스(Fructose), 질소원은 1-3% 모노소디움 글루타메이트(MSG), 유기화합물은 0.5-1% 글리세롤(glycerol), 미네랄은 0.1-0.3% 소디움 포스페이트(NaH2PO4), 배양 pH는 3-4, 배양 온도는 26-28℃인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 9.

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 GABA (γ-aminobutyric acid)를 함유하는 발아 메밀 홍국.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 홍국균을 이용한 GABA 생산방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 홍국균을 껍질을 벗기지 않은 발아된 메밀을 기질로 함유하는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 GABA (γ-aminobutyric acid)의 생산방법에 관한 것이다.

홍국 (紅麴)은 붉은 누룩이라는 뜻으로 쌀을 홍국균(Monascus sp.)으로 고체발효시킨 것으로 중국 한(漢)나라황제 유방이 처음 황실 음식으로 채택한 이래 조선 중기 우리나라에 유입되어 한방에서 어혈 해소제로 사용되고 있다. 특히 혈압을 떨어뜨리는데 효과가 높아 이미 홍국을 활용한 여러 가지 기능성 제품들이 선보이고 있다.

GABA (γ-aminobutyric acid)는 동, 식물의 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산의 일종으로, 동물에서는 뇌나 척수에 존재하는 억제계의 신경전달물질로서 작용하기 때문에, 신경 억제기능, 정신 안정기능, 혈압상승 억제작용, 뇌의 대사촉진작용, 동맥경화의 예방, 숙취해소, 피부노화방지 등의 효과를 나타내고, 식물에서는 해충의 공격이나 종자의 발아시 또는 기계적 자극, 온도, 수분, 빛, 산소 등의 여러 외부 환경적 요인에 의해 그 함량이 급격히 증진되므로, 식물세포의 활성화를 통한 성장과 자기보호기능에 중요한 역할을 하게 된다. 따라서, 식물체에서의 GABA는 외부환경을 적절히 조절하여 줌으로써, 그 함량을 크게 증진시킬 수 있는 물질인 것으로 알려져 있다. 최근에, GABA는 기능성 식품의 성분으로 그 활용성이 증가되고 있다.

메밀(Fagopyrum esculentum Moench; 일반적으로는 'buckwheat'이라고 부름)은 마디풀과에 속하는 일년생 초본식물로, 분류학상 곡류와 구별되지만 낱알의 성분조성이 곡류와 비슷하여 보통 잡곡으로 취급된다. 원산지는 시베리아로 현재는 동남아 각지에서 많이 재배하고 있으며, 우리나라에서는 삼국시대 이전부터 재배되어 왔다고 하는데 구체적인 문헌에 메밀이 처음으로 나타난 것은 1417년에 간행된 우리나라 최고의 의서인 향약구급방(鄕藥救急方)이다. 메밀은 과거에 식량이 부족할 때 구황(救荒)작물로 이용되어 왔으나, 최근들어 뛰어난 영양성분과 약리활성 그리고 독특한 맛으로 건강기능성 별미식으로 인기가 높다.

메밀에는 단백질 13%, 지방 2.5%, 전분 67% 정도 함유되어 있으며, 식이섬유 함유량이 높다. 특히, 메밀에 함유된 단백질은 균형있는 아미노산 조성을 가지고 있으며 필수 아미노산인 트립토판, 트레오닌, 라이신 등의 비율도 높을 뿐 아니라, 토코페롤, 페놀산, 플라보노이드(flavonoid)와 같은 항산화 물질을 다량 함유하고 있다. 플라보노이드는 담황색 또는 노란색의 색소화합물로서, 기본구조인 플라본(flavone)과 플라보놀(flavonol), 플라바논(flavanone), 플라바놀(flavanol) 및 이소플라본(isoflavone) 등의 유도체들이 있다. 특히, 메밀에는 플라보놀의 하나이며 비타민 P로 알려진, 루틴(rutin)이 많이 함유되어 있다 (참조: 성환길, 식품은 약이다, 한국메디칼인덱스, 1988; 및 Marshall, H.G. 및 Pomeranz, Y., Buckwheat: Description, Breeding, Production and Utilization, Advances in Cereal Science and Technology, Am. Ass. of Cereal Chem. Volume V, p.157, 1982).

홍국균의 발효에 관한 종래기술로는, 홍국균으로 발효시킨 메밀에 관한 특허출원(출원번호: 10-2002-0079448), 모나스쿠스속 균류에 의해 발효된 곡물을 포함하는 다류의 제조방법에 관한 특허출원(출원번호: 10-2000-0024564) 및 발아현미 또는 발아현미 함유곡류를 배지로 한 홍국의 제조방법 및 이를 이용한 식품의 제조방법에 관한 특허출원(출원번호:10-2001-0056427)이 있다. 그러나, GABA 고함유 홍국을 개발하기 위하여 다양한 곡류들을 적용한 특허출원이나 논문들은 아직 보고되지 않았으며, 홍국을 통한 GABA 고생산 배양법은 아직 국내외에 보고되지 않았다.

본 발명자들은 세계 최초로 껍질을 벗기지 않은 발아된 통메밀을 기질로 이용한 홍국을 이용한 GABA의 고생산 배양기술을 개발하였으며, 신경안정, 혈압강하효능을 가지는 GABA를 고함유 홍국의 개발을 위하여 수집된 36 종의 홍국균으로부터 GABA 고생산성을 가지는 균주를 새롭게 선발하였으며, 이 선발된 홍국균를 다양한 기질(곡류)에 배양시킨 후 HPLC를 이용하여 GABA 생산성을 정량적으로 분석한 결과 발아된 통메밀을 GABA 고생산을 위한 최적의 기질로 선발하였으며, 새로운 발아된 통메밀을 기질로 이용한 홍국의 GABA 고생산을 위한 고체배양 기술을 개발하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 홍국균의 고체배양기술을 이용한 고레벨의 GABA 생산방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 생산된 GABA를 함유하는 발아 메밀 홍국을 제공하는데 있다.

발명의 구성

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍국균을 껍질을 벗기지 않은 발아된 메밀을 기질로 함유하는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 GABA (γ-aminobutyric acid)의 생산방법을 제공한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 홍국균은 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (ATCC 6405), 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (IFO 32228) 또는 모나스쿠스 퍼퍼루스(Monascus purpureus) (ATCC 16358)인 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배지는 탄소원으로서 5% 내지 15% 농도의 푸럭토스(Fructose) 또는 글루코스(Glucose)를 함유하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배지는 질소원으로서 1% 내지 4% 농도의 모노소디움 글루타메이트(MSG), 알라닌(Alanine) 또는 (Glutamate)를 함유하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배지는 유기화합물로서 0.5% 내지 1.5% 농도의 글리세롤(Glyerol) 또는 에탄올(Ethanol)를 함유하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배지는 미네랄로서 0.1% 내지 0.5% 농도의 인산나트륨(NaH2PO4) 또는 질산나트륨(NaNO3)을 함유하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배양 pH는 pH 3 내지 6인 것을 특징으로 하며, 상기 배양 온도는 26 내지 30℃인 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 배지의 탄소원은 5-10% 푸럭토스(Fructose), 질소원은 1-3% 모노소디움 글루타메이트(MSG), 유기화합물은 0.5-1% 글리세롤(glycerol), 미네랄은 0.1-0.3% 소디움 포스페이트(NaH2PO4), 배양 pH는 3-4, 배양 온도는 26-28℃인 것을 특징으로 한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 생산된 GABA (γ-aminobutyric acid)를 함유하는 발아 메밀 홍국을 제공한다.

본 발명의 발아 메일 홍국은 혈압강하성분물질인 GABA를 고함유할뿐 아니라, 메밀의 함유된 유용대사산물을 부가적으로 함유하고 있다. 특히, 껍질을 벗기지 않은 발아된 통메밀에는 껍질에 다량 존재하는 항산화, 혈압강하 성분으로 잘 알려진 rutin과 quercetin이 대부분 껍질에 존재하며 게다가 발아시킬 경우는 더욱 향상 시킬 수 있다. 본 발명에서는 홍국의 GABA와 일반메밀보다 껍질을 벗기지 않은 발아메밀 속에 존재하는 다량으로 존재하는 rutin과 quercetin 같은 유용생리활성 물질들이 함께 함유된다.

본 발명은 Monascus 균주의 이차대사산물로 잘 알려진 GABA의 생산성 최적화를 위하여 GABA 고생산 균주를 선발하였으며 GABA의 생산성에 적합한 기질을 새롭게 선별하고 고체배양에 필요한 영양적인 조건과 외부의 환경적인 조건의 최적화를 통하여 새로운 고기능성 홍국의 고체배양 최적화 기술을 개발하고자 수행하였다. 이를 위하여 수집된 36 종의 Monascus 균주들을 고체배양 한 후 TLC와 HPLC를 이용하여 GABA의 함량을 분석하였으며 분석결과 GABA 생산성(1104 mg/kg)이 가장 우수한 Monascus purpureus ATCC 6405 균주를 선발하게 되었다. 그리고 이 균주를 10 여종의 다양한 곡류에 배양하여 껍질을 벗기지 않은 발아된 메밀이 GABA를 증대시키는 최적의 기질임을 확인하게 되었다. GABA 생산성 향상을 위한 영양학적, 환경학적 최적화 요소를 선별하기 위하여 고전적인 A factor at a time method를 이용하였다. 분석한 결과 GABA에 영향을 미치는 중요한 요인으로 MSG, pH, 온도가 선발되었으며 이들 3 요소를 이용하여 GABA 생산성을 증진시킬 수 있는 고체배양최적조건을 결정하기 위한 방법으로 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였으며 실험계획법으로 중심합성계획법을 사용하였다. 그 결과 MSG 1%, 26℃, pH 3.28일 때 GABA의 최적조건임을 알 수 있었으며, 이 조건에서 GABA는 3820 mg/kg으로 최적화 되지 않은 조건과 비교하여 GABA 생산성은 4 배 정도 증진 시킬 수 있었다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

(실시예 1) GABA 고생산능을 가진 균주의 선별

GABA 고생산능을 가진 홍국 균주의 선별을 위하여 표 1과 같이 수집된 36 종 Monascus 균주를 시험에 사용하였다. ATCC는 미국의 American Type Culture Collection (URL: www.atcc.org)에서 구입하였으며, IFO는 일본의 Institute for Fermentation, Osaka (URL: www.ifo.or.jp)에서 구입하였다.

[표 1]

A) Isolate and mutant strains	B) Type Strains
Monascus isolate No. 481	*Monascus pilosus* ATCC 22080
Monascus isolate No. 711	*Monascus pilosus* IFO 4520
Monascus mutant No.71102	*Monascus pilosus* IFO 4521
Monascus mutant No.71103	*Monascus pilosus* IFO 4480
Monascus mutant No.71104	*Monascus pilosus* IFO 8201
Monascus mutant No.71105	*Monascus pilosus* ATCC 16364
Monascus mutant No.71106	*Monascus pilosus* IFO 4487
Monascus mutant No.71107	*Monascus pilosus* IFO 4525
Monascus mutant No.71108	*Monascus ruber* ATCC 9203
Monascus mutant No.71109	*Monascus ruber* ATCC 16368
Monascus mutant No.711025	*Monascus ruber* IFO 7375
Monascus mutant No.711028	*Monascus vitreus* IFO 4523
Monascus isolate No. 801	*Monascus Kaoliang* ATCC 46596
Monascus isolate No. 802	*Monascus purpureus* IFO 4513
	Monascus purpureus IFO 32228
	Monascus purpureus ATCC 6405
	Monascus purpureus ATCC 16357
	Monascus purpureus ATCC 16358
	Monascus purpureus ATCC 16360
	Monascus purpureus ATCC 16361
	Monascus purpureus ATCC 36928
	Monascus purpureus ATCC 48162

1) 종배양 (seed culture)

PDA(Potato dextrose agar) 사면배지에 Monascus 균주를 접종하여 28℃, 7일 동안 배양된 plate를 0.05% Tween-80 멸균수용액으로 세척하고, 얻어진 포자를 희석액에 현탁하여 stock (1.5x107spores/ml)을 얻었다.

포자현탁액 2.5 ml을 50 ml Mizutani 배지(Glucose 5.0%, Bacto peptone 2.0%, KH2PO4 0.8%, CH3COOK 0.2%, NaCl 0.1%, MgSO4·7H2O 0.05%)(pH 5.0)에, 30℃, 150 rpm, 2 일 동안 배양하였다.

2) 고체배양방법

쌀 20g 과 증류수 14ml을 121℃에서 30 min동안 증기로 찐 후 50℃ 건조기에 2 시간~3 시간 정도 넣은 후 수분을 적당히 제거하여 Clean bench에서 2 ml의 종배양액을 접종한 후 10 일 동안 배양하였다. 고체배양 시 3일 동안은 30℃에서 4~10일째까지는 28℃의 낮은 온도에서 배양하였다.

3) GABA의 분석방법

(1) 홍국샘플에서 추출

1 g 홍국 샘플을 분말화한후 70 % Ethanol 9 ml을 혼합하여 150 rpm (30℃)으로 12 시간 동안 추출하였다.

(2) 홍국추출물의 유도체화

20 ㎕의 홍국추출물에 AccQ.Fluor Borate buffer 100 ㎕를 첨가한 후 AccQ.Fluor reagent (1 mg/ml) 20 ㎕를 넣어 잘 혼합하여 항온조에서 55℃, 10 min동안 유도체화 시켰다.

(3) HPLC를이용한 GABA의 분석 조건

HPLC 분석은 Varian Prostar 210 (USA) 기기를 이용하며, 분석용 컬럼으로는 Xterra MS C18 5 ㎛ column (reverse phase, 4.5×150 ㎜, Waters)을 사용한다. 용매조건으로 아래에 설명된 gradient mobile phase를 사용하였으며, 사용 용매는 Acetonitrile - 0.025 M sodium Acetate (pH 5.03), 유속은 1 ml/min 샘플 injection volume은 20 ㎕의 조건에서 실시한다. 검출은 248 nm 에서 photodiode array detector (Varian Protstar 320)를 사용하여 분석하였다. - Gradient conditions: 초기 100% A: 17 min, 93% A: 21 min, 90% A: 32 min, 66% A (all liner). 분석시간은 (injection-to-injection) 45 분이다.

표준 GABA 용액은 GABA를 1,000 mg/l distilled water 농도로 준비하여 working solutions을 위해 100 또는 1,000 mg/l 로 희석하였다. 200, 400, 600, 800, 1000 ppm 농도로 GABA 표준 곡선을 직선으로 얻었다. HPLC는 체류시간 (retention times) 28.858 min에서 GABA를 효과적으로 분리하였으며, 홍국추출물에서도 같은 체류시간에 GABA를 발견할 수 있었다. 도 1은 GABA standard (a) 와 extracted sample (b)의 HPLC 분석 결과이다.

상기 표 1의 36종의 균주을 GABA 생산능에 대해 스크리닝하였다. 증기로 찐 쌀에서서의 7일째 배양물에 대해 GABA 생산능을 비교 평가하였다. 그 결과, 시험한 36 종의 균주들 가운데에서 Monascus purpureus ATCC 6405, Monascus purpureus IFO 32228 및 Monascus purpureus ATCC 16358의 3종이 820 to 1104 mg/kg의 GABA를 생산하여 우수한 것으로 나타났으며, 그중에서 Monascus purpureus ATCC 6405가 1104 ppm으로 GABA 생산능이 가장 우수한 균주로 선정되었다. 도 2 및 3은 각 균부별 고체배지에서 GABA의 농도(mg/kg)를 나타내는 그래프이다.

(실시예 2) GABA 고생산을 위한 최적의 기질 선택

실시예 1에서 GABA 생산능이 우수한 균주로 선정된 Monascus purpureus ATCC 6405의 GABA 생산성을 더욱 향상시키기 위하여 본 실시예에서는 기존의 홍국의 기질로써 사용되었던 곡류(쌀, 보리)들과 최적의 신규한 기질 선택을 위하여 다양한 곡류(기장, 차조, 율무, 수수, 메밀, 발아메밀, 발아현미, 현미)들을 대상으로 검토하였다. 종배양은 실시예 1의 실험방법과 동일하고, 고체배양방법은 쌀외에 보리, 수수, 차조, 기장, 현미, 발아현미, 율무, 메밀 및 발아메밀 각각을 대상으로 한 것을 제외하고 실시예 1의 실험방법이 동일하였으며, GABA 분석방법은 실시예 1과 동일하였다.

분석 결과, 시험한10 종의 다양한 곡류를 이용한 홍국들 가운데에서 발아된 메밀 홍국의 GABA 함량이 1495 ppm을 생산하여 GABA 생산능이 가장 우수한 균주로 선정되었다. 도 4는 다양한 곡류의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. 도 5는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의해 발효된 다양한 곡류 홍국을 촬영한 사진들이다.

GABA 생산능이 우수한 Monascus purpureus ATCC 6405와 발아메밀을 기질로써 이용하여 생산력은 향상시켰지만 국외적으로(대만) 보고된 최적화한 홍국의 GABA 함유량(2000ppm~6000ppm)에는 미치지 못하였기 때문에 새롭게 발아된 메밀을 이용한 홍국의 영양학적, 환경학적 관점에서 최적화된 GABA 고 생산성 홍국의 고체배양기술의 개발을 시도하였다.

(실시예 3) 일회일요인법(A factor at a time method)에 의한 GABA 고생산 고체배양기술개발

1) 영양요인 최적화

고전적인 최적화 방법인 “A factor at a time method”를 이용하여 고체배양 시 영양학적, 환경학적으로 중요한 최적화 요소들과 그들의 최적농도를 결정하여 최적화하였다. 고체 배양 시 영양물질 중에서 GABA 생산성 향상의 최적요인을 분석하기 위하여 8 종 탄소원(glucose, fructose, xylose, galactose, mannitol, lactose, sucrose, maltose), 13 종 질소원(monosodium glutamic acid, yeast extract, beef extract, soytone, peptone, valine, orinitine, methionine, lysine, leucine, glycine, glutamate, alanine, control), 9 종 미네랄(NaNO3, FeSO4, ZnSO4, Na2HPO4, NaHPO4, KH2PO4, K2HPO4, MgSO4), 6 종 유기화합물(Olive oil, soybean oil, oleic acid, ethanol, polyethylene glycol 2000, glycerol)을 배양 시 각각 따로 첨가하여 배양하였다.

고체배양방법을 위해, 250ml 삼각플라스크에 발아메밀 20g 과 20ml 증류수 (다양한 탄소원, 질소원, 미네랄, 유기원 첨가)을 121℃에서 30 min동안 증기로 찐 후 50℃ 건조기에 2 시간~3 시간 정도 넣은 후 수분을 적당히 제거하여 clean bench에서 2 ml의 종배양액을 접종한 후 10 일 동안 배양하였다. 고체배양 시 3일 동안은 30℃에서 4~10일째까지는 28℃의 낮은 온도에서 배양하였다.

분석결과, 탄소원으로서는 푸럭토스(Fructose) 또는 글루코스(Glucose)가 좋은 탄소원으로 나타났으며, 이중에서 Fructose이 GABA 생합성에 가장 좋은 탄소원으로 선정되었으며, 최적 첨가 농도는 10%였다. 도 6은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 탄소원의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 7은 Fructose의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

질소원으로서는 모노소디움 글루타메이트(MSG), 알라닌(Alanine) 또는 (Glutamate)가 좋은 것으로 나타났으며, 이중에서 MSG는 GABA 생합성에 가장 좋은 질소원으로 선정되었으며, 최적 첨가 농도는 3%였다. 도 8은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 질소원의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 9는 MSG의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

유기화합물로서는 글리세롤(Glyerol) 또는 에탄올(Ethanol)이 좋은 것으로 나타났으며, 이중에서 Glycerol은 GABA 생산성 향상에 가장 좋은 유기화합물 선정되었으며, 최적 첨가 농도는 1%였다. 도 10은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 유기화합물의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 11은 Glycerol의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

미네랄로서는 인산나트륨(NaH2PO4) 또는 질산나트륨(NaNO3)이 좋은 것으로 나타났으며, 이중에서 NaH2PO4은 GABA 생산성 향상에 가장 좋은 유기화합물 선정되었으며, 최적 첨가 농도는 0.25%였다. 도 12는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 미네랄의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 13은 NaH2PO4의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

2) 환경요인 최적화

고체 배양 시 환경요인 중에서 GABA 생산성 향상의 최적요인을 분석하기 위하여 각기 다른 온도 (26℃, 28℃, 30℃, 32℃, 34℃, 36℃), pH (2,3,4,5,6,7), 접종량(5%, 10%, 15%, 20%, 25%)을 적용하여 배양 후 분석하였다.

고체배양방법을 위해, 250ml 삼각플라스크에 발아메밀 20g 과 20ml 증류수 (다양한 pH 조절)을 121℃에서 30 min동안 증기로 찐 후 50℃ 건조기에 2 시간~3 시간 정도 넣은 후 수분을 적당히 제거하여 clean bench에서 2 ml의 종배양액을 접종한 후 10 일 동안 배양한다. 고체배양 시 3일 동안은 30℃에서 4~10일째까지는 다양한 온도에서 배양하였다.

분석 결과, 배양 pH는 3 내지 6이고, 배양 온도는 26 내지 30℃인 것이 좋은 것으로 나타났다. 이중에서도, 고체배양 시 pH 5.0 일때 GABA 생산성이 가장 높았으며, 고체배양 시 온도는 28℃ 일때 GABA 생산성이 가장 높았으며, 고체배양 시 접종량 10% 일때 GABA 생산성이 가장 높았다. 도 14는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 pH 조건의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 15는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 접종량의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다. 도 16은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 온도 조건의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

(실시예 4) 반응표면분석법(Response surface methodology)에 의한 GABA 고생산 고체배양기술개발

"A factor at a time method"는 고전적인 최적화 배양방법의 하나로써 하나의 조건에서 하나의 요인이 미치는 영향에 대해서 분석하기 위한 좋은 방법이지만 최적화된 각각의 요인들이 혼합되면 요인들 상호간의 영향에 의해서 최적화된 요인들의 최적 농도에서 배양결과가 반드시 최대의 생산량을 나타내지 못하기 때문에 각 요인들과 농도 상호간에 있을 수 있는 모든 경우의 수에 대한 결과를 통계학적 방법으로 최근 다양하게 응용 되어지고 있는 반응표면분석법을 이 실험에 도입하게 되었다.

1) Basal medium

A factor at a time method를 통해서 인정된 중요한 요인(MSG, pH)들을 기본배양액으로 첨가하여 주었다. 이 기본 배양액은 고체배양할 때 증류수를 대신하여 첨가하였다.

- 탄소원: 5% fructose (1g fructose /발아메밀 20g)

- 미네랄: 0.1% NaH2PO4 (0.02g NaH2PO4 /발아메밀 20g)

- 유기화합물: 0.5% glycerol (0.1ml glycerol /발아메밀 20g)

- 질소원: 1~5%MSG (0.2~ 2g MSG /발아메밀 20g)

- 초기 pH를 2~6으로 조절하였다(Acetic acid, NaOH 사용).

2) 고체배양방법

250 ml 삼각플라스크에 발아메밀 20 g 과 20 ml basal medium을 넣은 후 autoclave를 이용하여 121℃에서 30 min동안 증기로 찐 후 50℃ 건조기에 2 시간~3 시간 정도 넣은 후 수분을 적당히 제거하여 clean bench에서 2 ml의 종배양액을 접종한 후 10 일 동안 배양하였다. 고체배양 시 3일 동안은 30℃에서 4~10일째까지는 RSM에 적용된 온도 맞추어서 각각 배양하였다.

3) 분석 결과

본 실험에서 처리 조합을 할당하기 위해 Central Composite Design로서 3-factor 5-level response surface experiment를 사용하였다. 본 실험에서, Monascus purpureus ATCC 6405의 응답인 GABA의 양(mg/kg)은 하기 표 2에 기술된 3가지 요인(MSG, pH, Temperature)의 영향하에 있다고 가정하였다. 데이터는 STATGRAPHICS Plus Version 5.1 (USA)를 사용하여 분석하였다. Fitted model의 등식은 다음과 같다.

$$GABA = -3035.66 - 2936.16 \times MSG - 1072.29 \times Temperature - 2405.81 \times pH - 95.5365 \times MSG2 + 116.583 \times MSG \times Temperature - 64.834 \times MSG \times pH - 39.6737 \times Temperature^2 + 215.056 \times Temperature \times pH - 475.57 \times pH^2$$

[표 2] Central composite design(CCD)을 위한 변수들과 그 레벨

Variables	Coded variable				
	-2	-1	0	1	2
MSG (%)	1	2	3	4	5
Temperature (℃)	26	28	30	32	34
Initial Ph	2	3	4	5	6

* Coded variable levels are given by the following equations; X1 code=(X1-3)/1, X2 code= (X2-30)/2, X3 code=(X3-4)/1.

[표 3] Central composite design (CCD)의 실험디자인과 결과

No	MSG (g/100 g)	Temperature	pH	GABA (mg/kg)
1	2	28	3	3841
2	4	28	3	2915
3	2	32	3	2649
4	2	28	5	3135
5	4	32	3	2177
6	4	28	5	1471
7	2	32	5	3487
8	4	32	5	3165
9	5	30	4	2927
10	1	30	4	2162
11	3	34	4	1294
12	3	26	4	2230
13	3	30	6	613
14	3	30	2	0
15©	3	30	4	1857
16©	3	30	4	3021

No. 15©, 16© were there replication of center points

이 모델의 fit은 0.88로 계산된 coefficient of determination R2로 체크되었으며, 이는 응답에서 88.3397%의 variability를 가리킨다. 이 모델의 최대점을 얻기 위한 3가지 변수의 최적수치는 MSG, temperature, pH 각각 1.0 %, 26 ℃, 3.28로 계산되었다. 이 최대점에서 모델은 3820 mg/kg GABA의 최대 응답을 예상하였다.

따라서, 최적의 고체배양조건은 아래와 같으며, 이때, 3820 mg/kg GABA의 최대 응답을 보이는 것으로 예상되었다.

- 탄소원: 5% fructose (1g fructose /발아메밀 20g)

- 미네랄: 0.1% NaH2PO4 (0.02g NaH2PO4 /발아메밀 20g)

- 유기화합물: 0.5% glycerol (0.1ml glycerol /발아메밀 20g)

- 질소원: 1 %MSG (0.2 g MSG /발아메밀 20g)

- 초기 pH를 3.28으로 조절하였다(Acetic acid, NaOH 사용).

- 배양초기는 30℃로 동일하며 4일~10일 동안의 최적배양온도는 26℃ 였다.

도 17은 GABA production의 Main effects plot이다. 도 18은 GABA production의 Interaction plot이다 (A: MSG, B: Temperature, C: pH). 도 19는 GABA production의 Three-dimensional response surface plots이다. 온도 26℃에서 GABA 생산에 대한 MSG, temperature 및 pH의 combined effect를 나타낸다. 도 20은 GABA production의 Contour plot이다. 온도 26℃에서 GABA 생산에 대한 MSG, temperature 및 pH의 combined effect를 나타낸다. 도 21은 Desirability의 Three-dimensional response surface plots이다. 온도 26℃에서 GABA 생산에 대한 MSG, temperature 및 pH의 combined effect를 나타낸다. 도 22는 Estimated response surface의 Contour plot이다. 온도 26℃에서 GABA 생산에 대한 MSG, temperature 및 pH의 combined effect를 나타낸다. 도 22는 optimum conditions (MSG 1%, 26℃, pH 3.28)에서 GABA content가 3820 mg/kg로 증가할 것으로 예상한다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 신경안정, 혈압강하 효과를 가지는 γ-aminobutyric acid (GABA) 고생산하는 홍국균을 선발하였으며, 이 선발된 홍국균을 이용하여 다양한 곡류를 기질로 이용한 홍국들을 제조하고 그중에서 GABA 생산성이 탁월한 발아된 통메밀을 기질로 선택하여 새로운 고기능성 홍국을 개발하였으며, 또한 발아된 통메밀 홍국의 GABA 생산성을 더욱 향상시키기 위하여 고체배양 최적화 조건을 개발하였다. 특히, “A factor at a time” 방법을 이용하여 GABA의 최적화 배

양방법 개발하였으며, 새로운 고체배양방법에 껍질을 벗기지 않은 통메밀을 기질로 이용한 홍국에서는 GABA 농도가 일반적인 쌀을 기질로한 홍국과 비교하여 4 배 이상 높일 수 있었으며, 통메밀을 발아시켜 배양함으로써 메밀의 유용성분인 rutin과 quercetin의 함량을 최대화 시킬 수 있었다. 본 발명에 따르면, 홍국의 발효기질로써 GABA 생산성을 증진시키는 껍질이 벗겨지지 않은 발아된 통메밀을 이용한 고체배양방법 확립함으로써, 새로운 발효기질 사용으로 다기능성 홍국의 개발을 통하여 활용도를 높일 수 있을 것으로 기대되며, 기능성이 강화된 홍국을 다양한 식품의 원재료로 활용할 수 있으며, 이를 통한 새로운 식음료의 개발 또한 가능하며, 국내외 기능성식품 시장에서 홍국의 활용도가 점차 높아지고 있으므로, 다양한 기능성 식품의 원재료로 활용성이 뛰어날 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 GABA standard (a) 와 extracted sample (b)의 HPLC 분석 결과이다.

도 2 및 3은 각 균부별 고체배지에서 GABA의 농도(mg/kg)를 나타내는 그래프이다.

도 4는 다양한 곡류의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의해 발효된 다양한 곡류 홍국을 촬영한 사진들이다.

도 6은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 탄소원의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 7은 Fructose의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

도 8은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 질소원의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 9는 MSG의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

도 10은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 유기화합물의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 11은 Glycerol의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

도 12는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 미네랄의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 13은 NaH2PO4의 농도에 따른 GABA 생산능을 나타낸 그래프이다.

도 14는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 pH 조건의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 15는 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 접종량의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 16은 Monascus purpureus ATCC 6405에 의한 다양한 온도 조건의 GABA 생산능에 대한 효과를 나타난 그래프이다.

도 17은 GABA production의 Main effects plot이다.

도 18은 GABA production의 Interaction plot이다.

도 19는 GABA production의 Three-dimensional response surface plots이다.

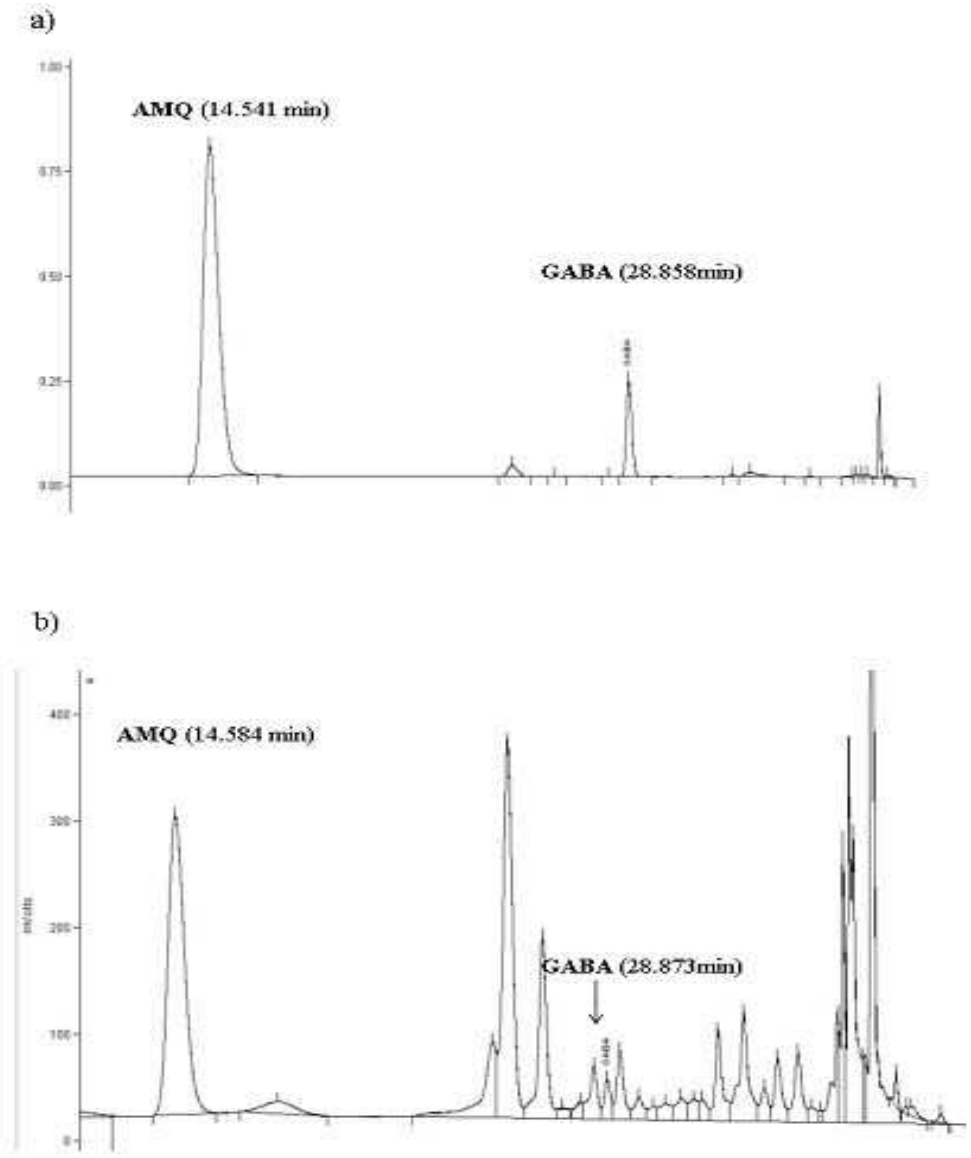
도 20은 GABA production의 Contour plot이다.

도 21은 Desirability의 Three-dimensional response surface plots이다.

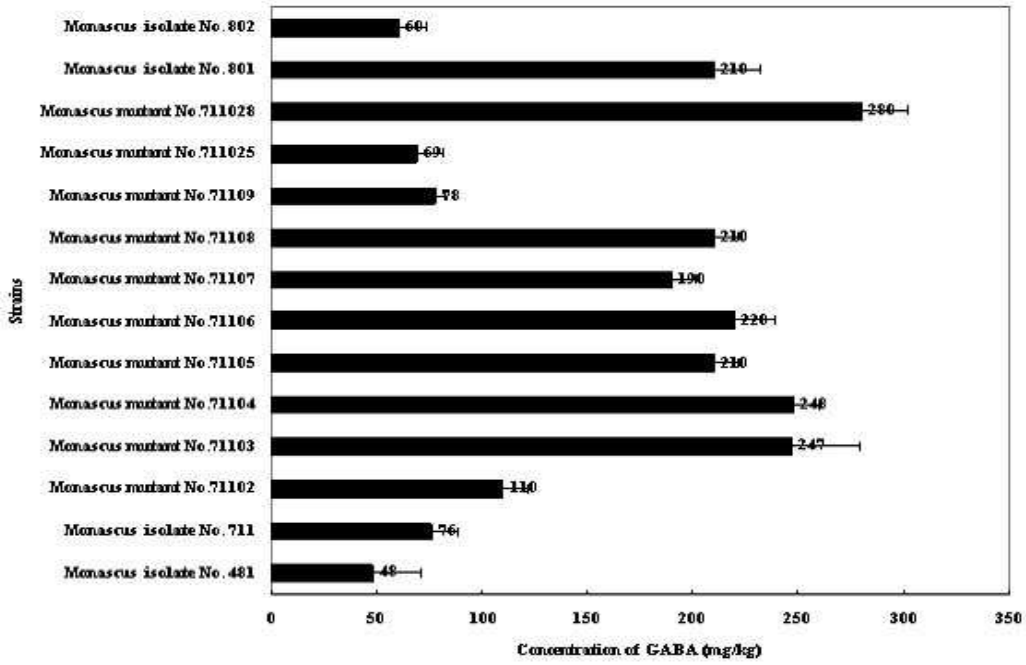
도 22는 Estimated response surface의 Contour plot이다.

도면

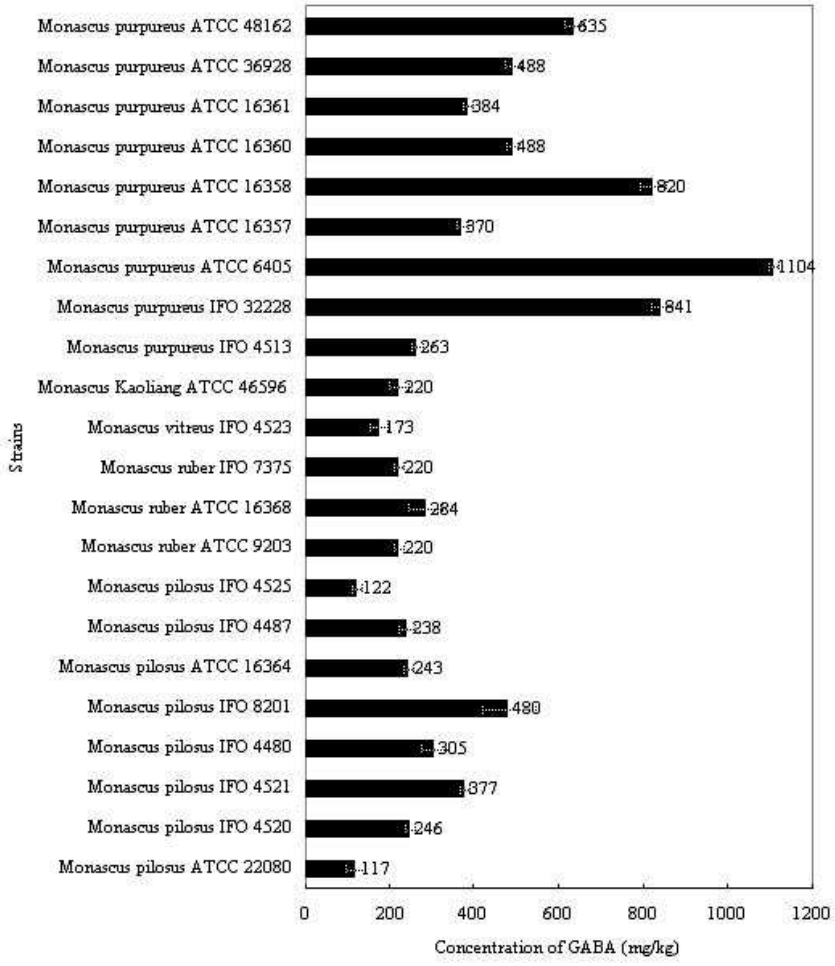
도면1



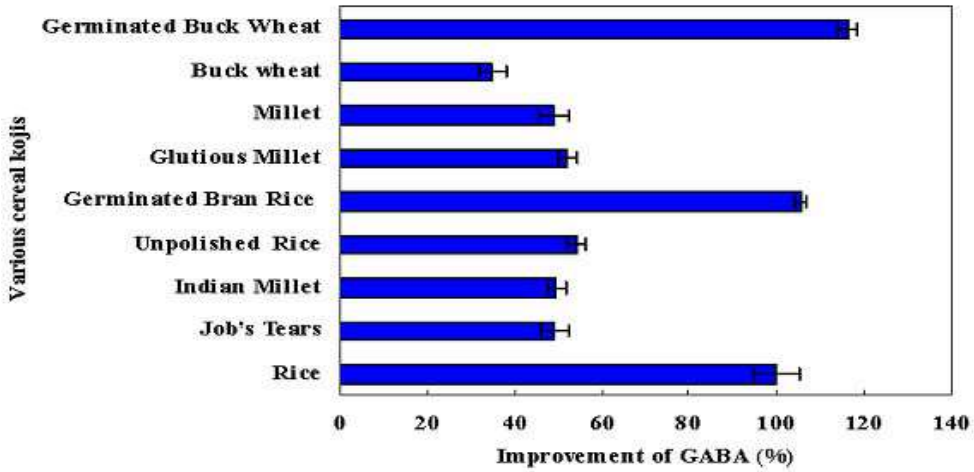
도면2


Monascus isolate No. 802
Monascus isolate No. 801
Monascus mutant No.711028
Monascus mutant No.711025
Monascus mutant No.71109
Monascus mutant No.71108
Monascus mutant No.71107
Monascus mutant No.71106
Monascus mutant No.71105
Monascus mutant No.71104
Monascus mutant No.71103
Monascus mutant No.71102
Monascus isolate No. 711
Monascus isolate No. 481
Strains
0
50
100
150
200
250
300
350
Concentration of GABA (mg/kg)

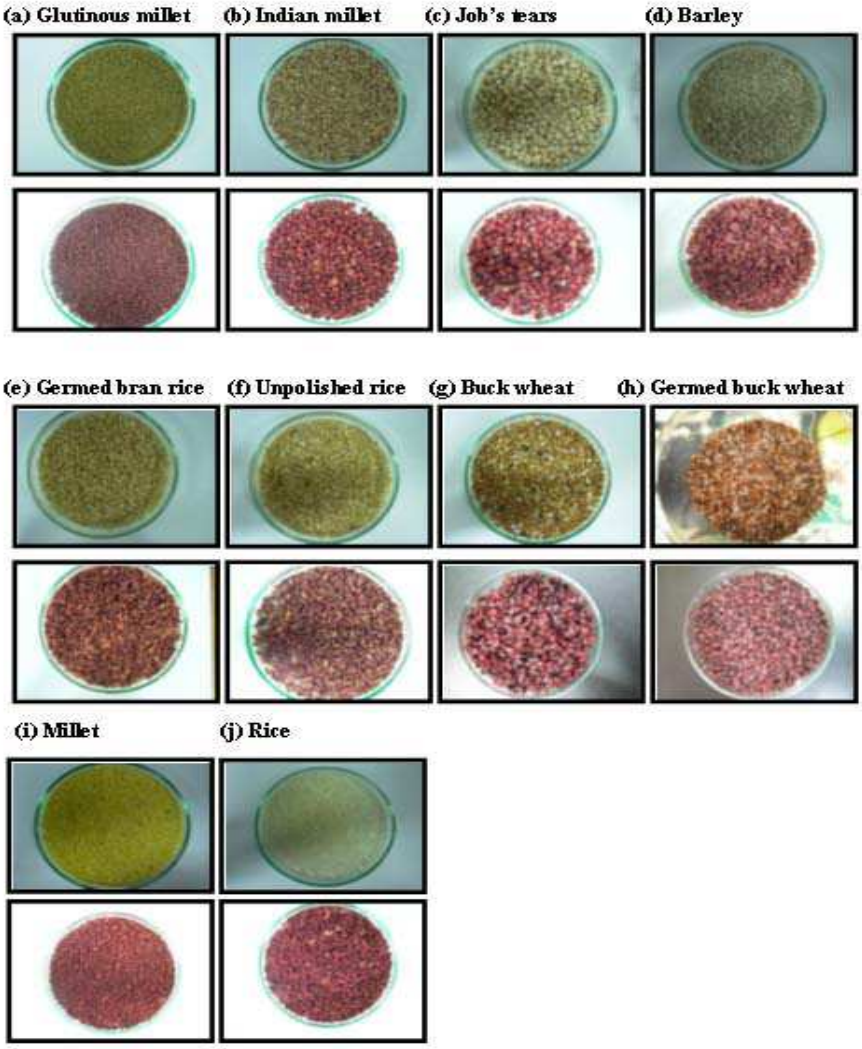
도면3


Monascus purpureus ATCC 48162
635
Monascus purpureus ATCC 36928
488
Monascus purpureus ATCC 16361
384
Monascus purpureus ATCC 16360
488
Monascus purpureus ATCC 16358
820
Monascus purpureus ATCC 16357
370
Monascus purpureus ATCC 6405
1104
Monascus purpureus IFO 32228
841
Monascus purpureus IFO 4513
263
Monascus Kaoliang ATCC 46596
220
Monascus vitreus IFO 4523
173
Monascus ruber IFO 7375
220
Monascus ruber ATCC 16368
284
Monascus ruber ATCC 9203
220
Monascus pilosus IFO 4525
122
Monascus pilosus IFO 4487
238
Monascus pilosus ATCC 16364
243
Monascus pilosus IFO 8201
480
Monascus pilosus IFO 4480
305
Monascus pilosus IFO 4521
377
Monascus pilosus IFO 4520
246
Monascus pilosus ATCC 22080
117
Strains
0
200
400
600
800
1000
1200
Concentration of GABA (mg/kg)

도면4

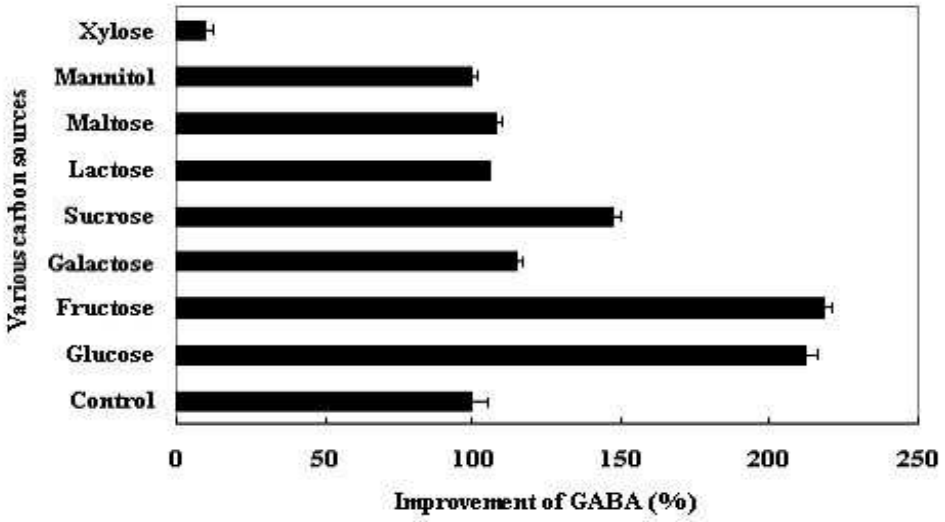


도면5

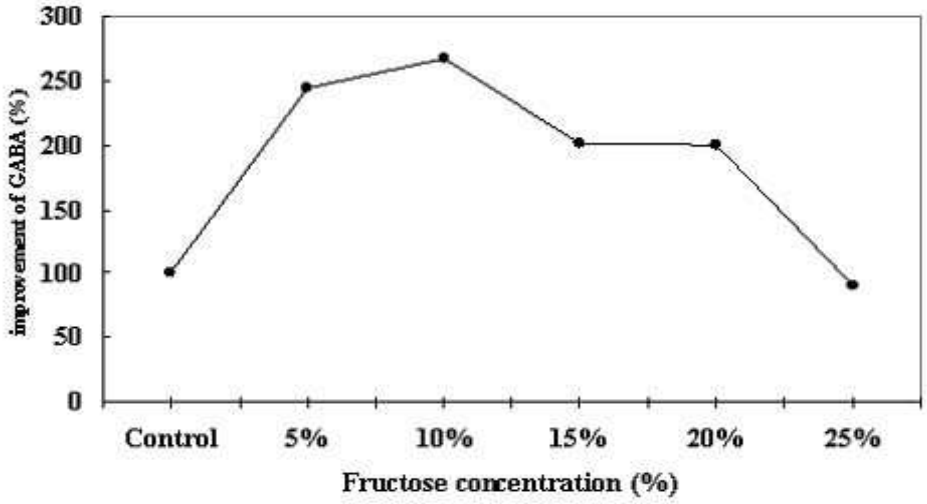


Fermented cereal kojis by *Monascus purpureus* ATCC 6405

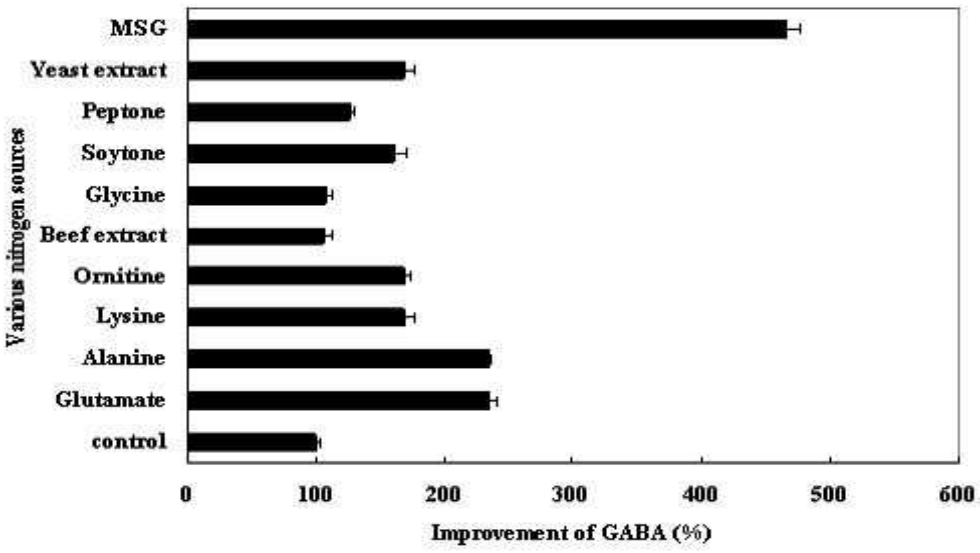
도면6


Xylose
Mannitol
Maltose
Lactose
Sucrose
Galactose
Fructose
Glucose
Control
Various carbon sources
0
50
100
150
200
250
Improvement of GABA (%)

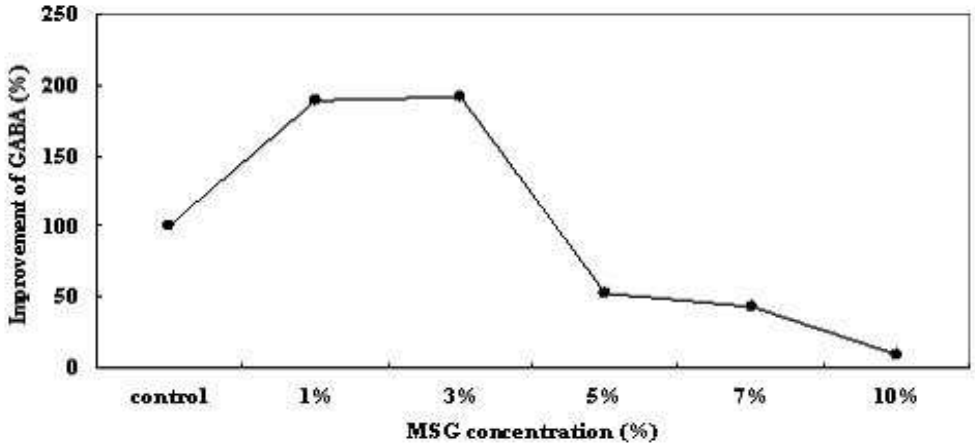
도면7


300
250
200
150
100
50
0
improvement of GABA (%)
Control
5%
10%
15%
20%
25%
Fructose concentration (%)

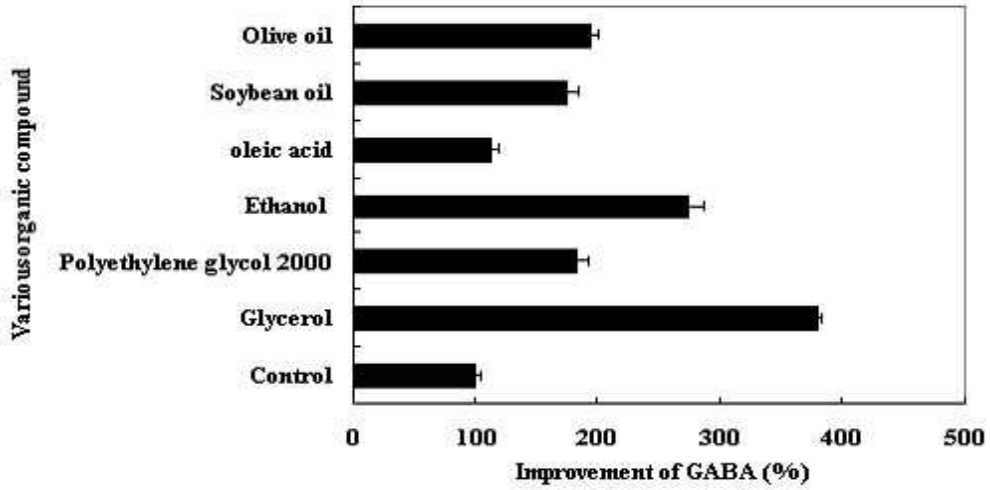
도면8


MSG
Yeast extract
Peptone
Soytone
Glycine
Beef extract
Ornitine
Lysine
Alanine
Glutamate
control
Various nitrogen sources
0
100
200
300
400
500
600
Improvement of GABA (%)

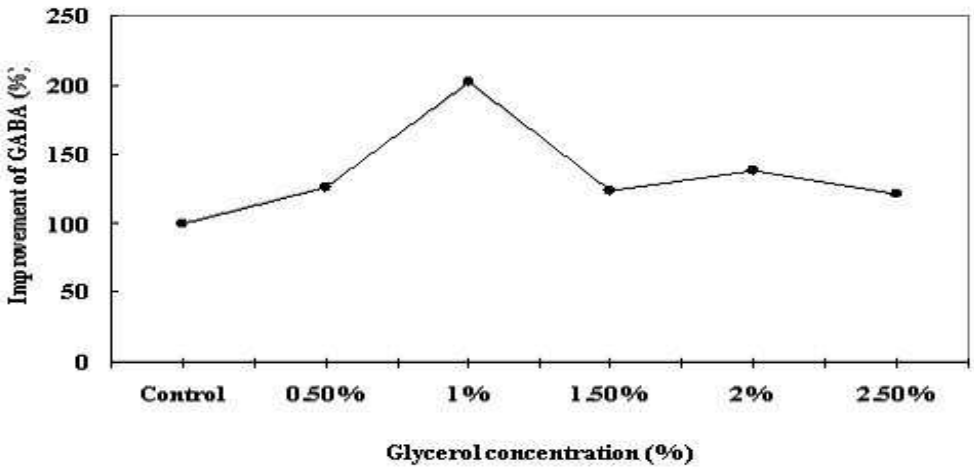
도면9



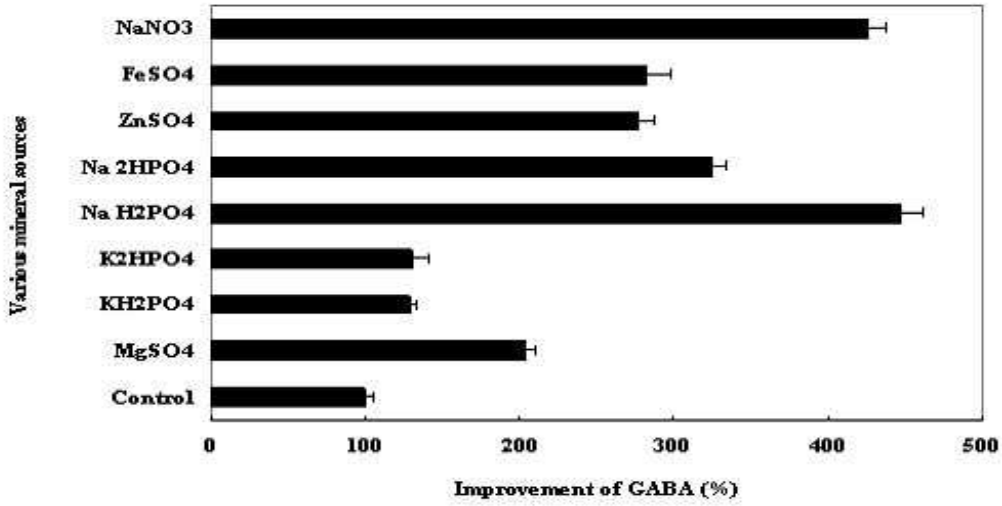
도면10



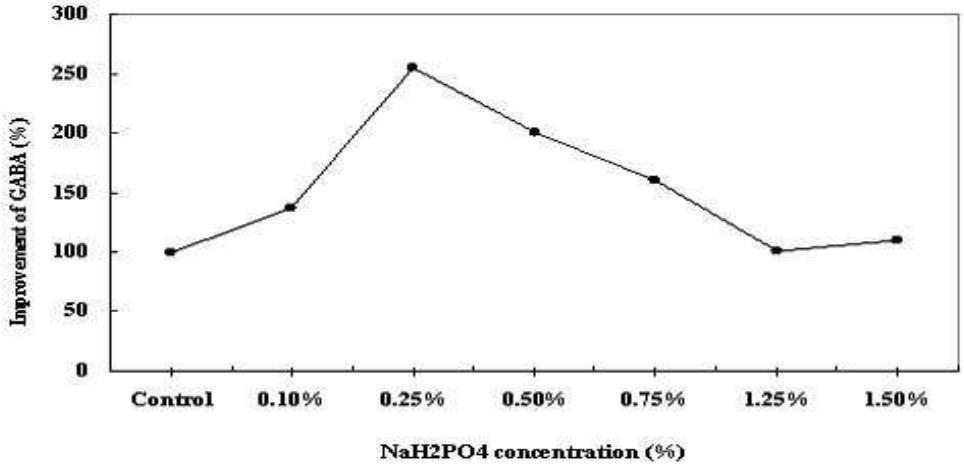
도면11



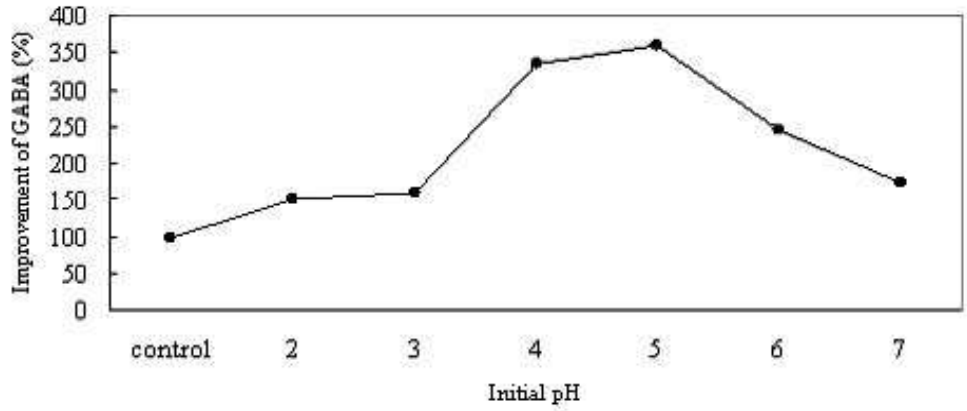
도면12



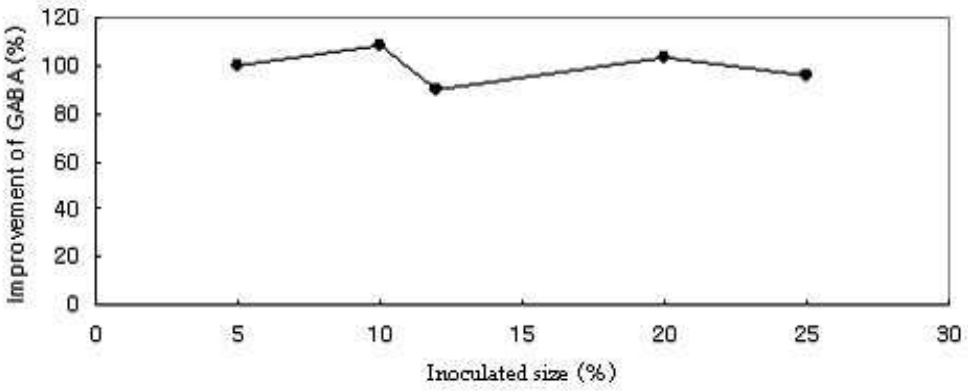
도면13



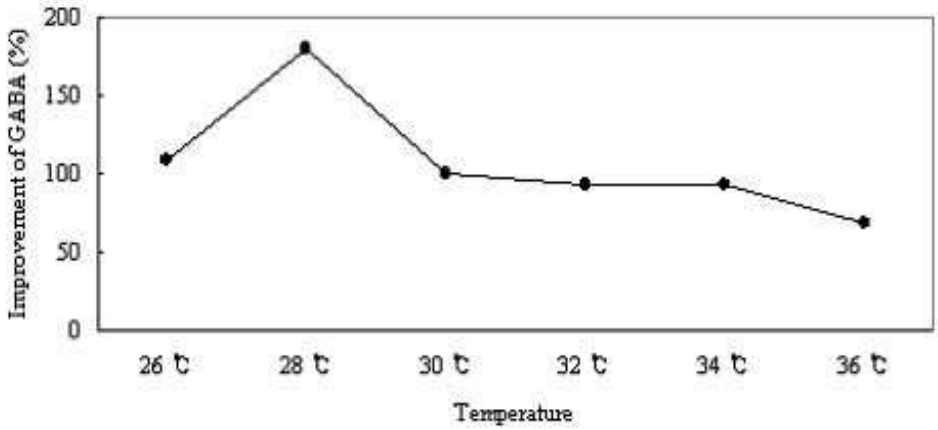
도면14



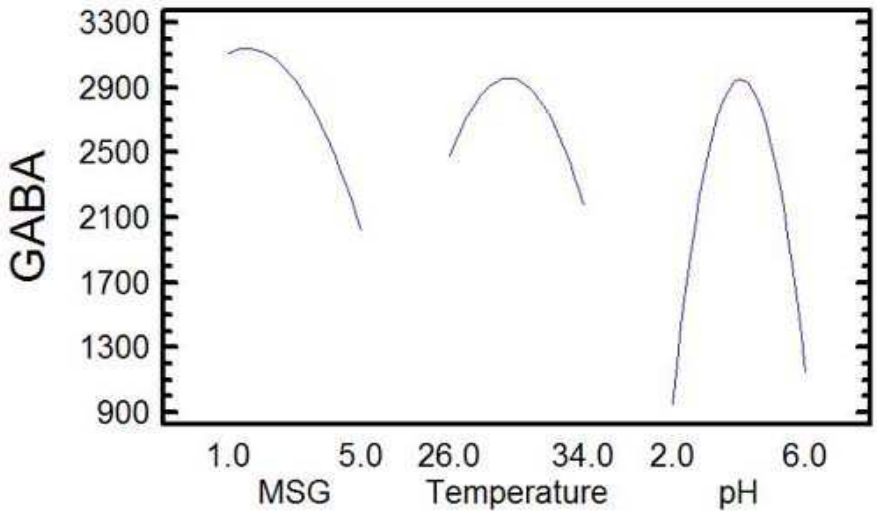
도면15



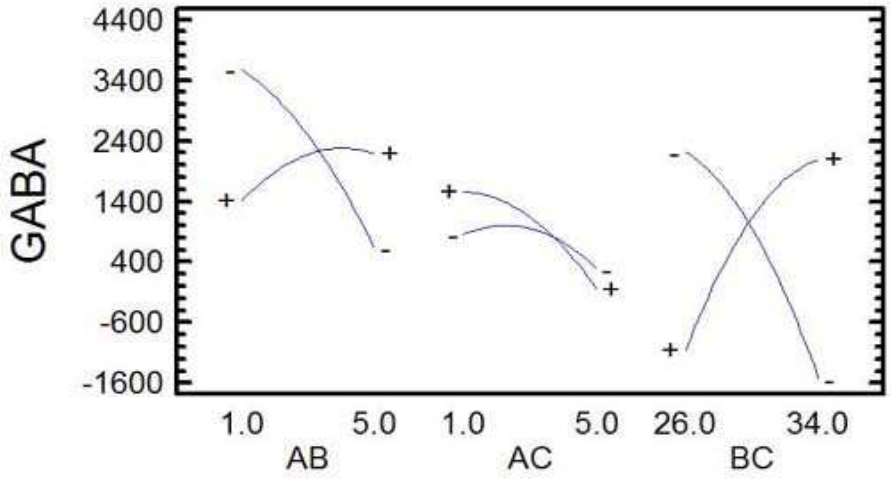
도면16



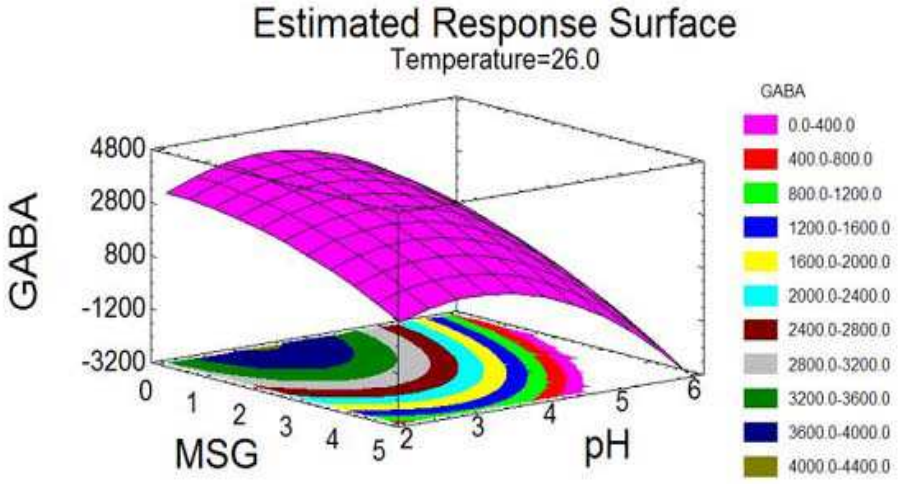
도면17



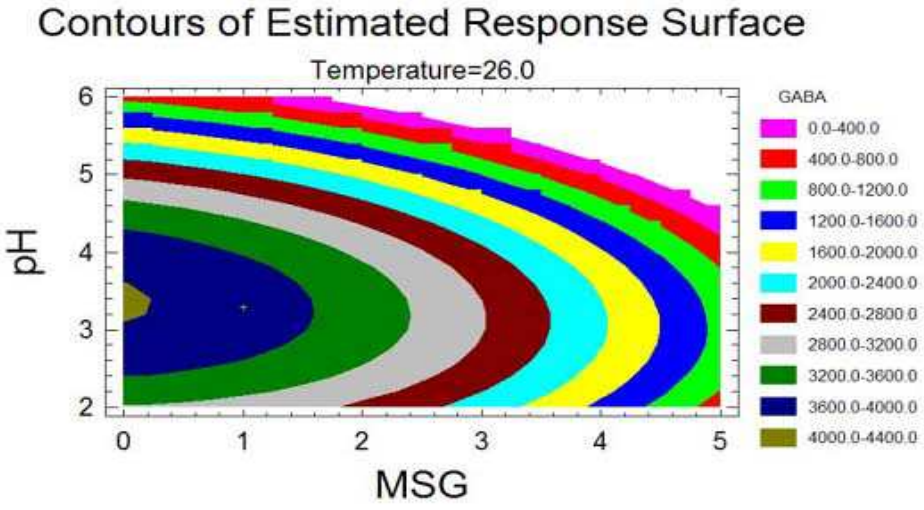
도면18



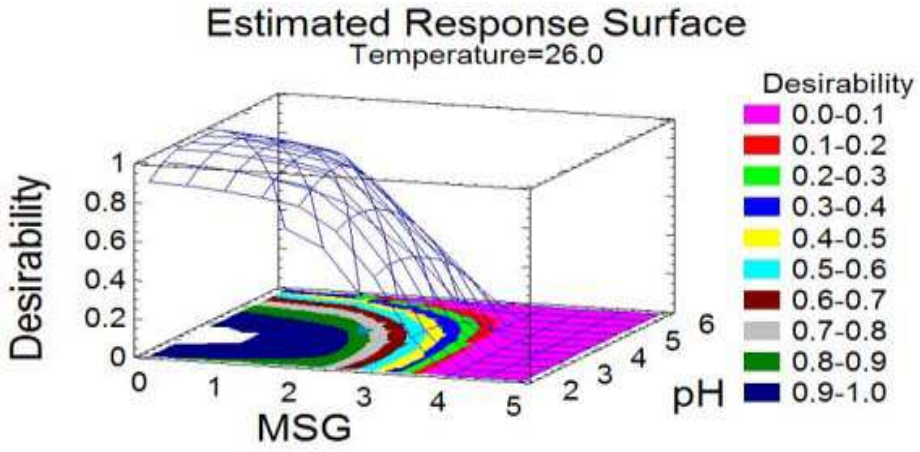
도면19



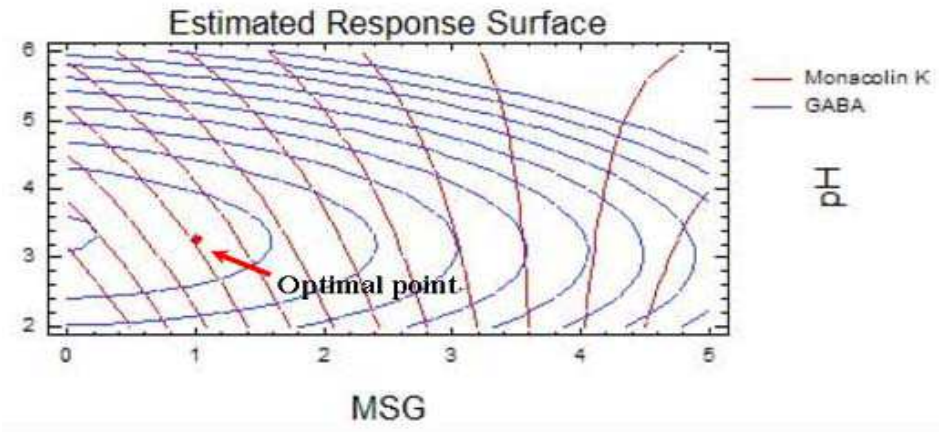
도면20



도면21


Estimated Response Surface
Temperature=26.0
Desirability
0.0-0.1
0.1-0.2
0.2-0.3
0.3-0.4
0.4-0.5
0.5-0.6
0.6-0.7
0.7-0.8
0.8-0.9
0.9-1.0
Desirability
MSG
pH

도면22


Estimated Response Surface
Monacolin K
GABA
Optimal point
MSG
pH